

2013 臺灣國際科學展覽會

優勝作品專輯

作品編號	080002
參展科別	生物化學
作品名稱	澱粉吸附蛋白質與澱粉糖的分子交互作用
得獎獎項	四等獎

就讀學校 臺北市立松山高級中學

指導教師 陳彥宏、孫玉珠

作者姓名 白軒宇

關 鍵 字 澱粉水解酶、澱粉吸附蛋白質、澱粉糖

作者簡介



我是白軒宇，目前為松山高中二年級學生。我從小就對自然有興趣，喜歡穿梭於大自然之間，對於各種生物都很好奇也愛研究，進入高中後選擇第三類組，並以進入生物或醫學相關的大學科系為目標，最有興趣的是獸醫系。我平常喜歡聽流行音樂、閱讀小說、打羽球和打籃球，目前是松山高中男籃社球隊經理。我曾參加科教館的青少年科技人才培育計畫，目前為清大的生命科學人才培育計畫的學員之一，對生命科學研究很有興趣，很希望能在這次科展獲得寶貴的國際交流經驗及增廣見聞。

摘要

顆粒澱粉可和碘形成藍色錯合物(starch-iodine complex)，我從種子發芽澱粉酶實驗了解澱粉酶(amylose)具糖解酵素活性，會分解澱粉盤上的澱粉，並使澱粉失去與碘形成螺旋狀澱粉-碘錯合物的能力，讓藍色澱粉盤出現透明水解圈。

通常澱粉酶之分子結構包含澱粉吸附區及催化區，分別負責吸附大分子或不可溶性澱粉糖(amylose)配體及分解澱粉糖成可溶性小分子糖。本計劃選用分子量、溶解度不同的澱粉糖分別與碘液反應，再加入澱粉酶(glucoamylase)或其澱粉吸附區(starch binding domain, SBD)，發現二者均會破壞澱粉糖與碘結合之螺旋狀結構。分析二者之反應效率，可比較不同蛋白質解開澱粉-碘錯合物之能力。此外，本研究亦比較正常與突變株二聚體澱粉吸附區(SBD dimer)之解開澱粉-碘錯合物反應活性，再查詢文獻、比對不同蛋白質的序列、結構、及功能特性進行綜合分析。根據本研究結果，澱粉吸附蛋白質序列中解開配體螺旋結構最重要的官能基為兩個具有苯環的胺基酸，且二者對於可溶性及不可溶性配體之影響不同。本研究提供科學家了解自然界具備重複澱粉吸附區(tandem repeat)功能的邏輯方法，未來可應用於澱粉代謝、合成相關之蛋白質設計、結構預測、及功能分析。

一、前言

文獻報導顆粒澱粉可和碘形成藍色錯合物(starch-iodine complex)[1]，我從種子發芽澱粉酶實驗了解澱粉酶(amylose)會分解澱粉盤上的澱粉[2]，並使澱粉失去與碘形成澱粉-碘錯合物的能力。已知藍色錯合物可用光譜儀檢測其可見光吸收圖譜[3][4][5]，因此，本計劃選用分子量 10^3 - 10^7 Dalton、且溶解度不同的澱粉及澱粉糖(amylose)分別與碘液反應，欲探討澱粉-碘錯合物螺旋結構的生物化學特性，包括：對於錯合物顏色變化及結構穩定性的影響，以及澱粉水解酶和澱粉吸附蛋白使澱粉-碘錯合物結構改變的生化反應活性。

澱粉為生物體中由葡萄糖單元連接成的巨分子(macromolecule)，其組成包括直鏈澱粉(amylose)及支鏈澱粉(amylopectin)，其合成、分解均受到許多蛋白質或酵素的調控。真菌分泌之葡糖澱粉酶(glucoamylase、GA)結構包括澱粉吸附區域(starch binding domain、SBD)及酵素催化區域(catalytic domain、CD)，可將高分子量的澱粉完全分解成葡萄糖單元，為製酒過程的重要酵素。

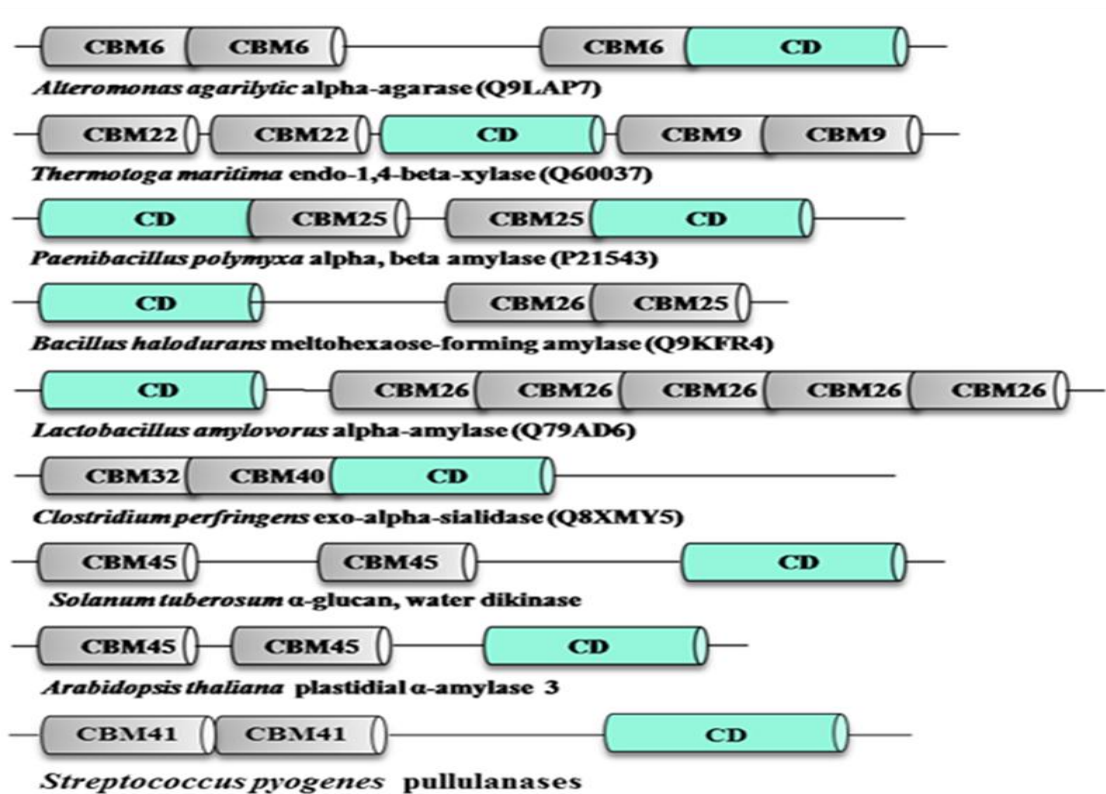
自然界中許多具有分解、合成、或運輸醣類分子的酵素結構同時具有碳水化合物吸附模組(carbohydrate binding module、CBM)及酵素催化區域(catalytic domain)功能。科學家已發現的 CBM 家族蛋白質的特性均收錄於 Carbohydrate Active EnZyme (CAZY)資料庫中，其網址為 <http://www.cazy.org>。目前已知具備澱粉吸附特性的 SBD 存在於 10 種含 CBM 的酵素家族，包括 CBM20、CBM21、CBM25、CBM26、CBM34、CBM41、CBM48、CBM53、及 CBM58，如圖一所示。



圖一 天然 CBM 澱粉吸附區家族

CBM20、CBM21、CBM25、CBM26、CBM34、CBM41、CBM48、CBM53、及 CBM58 之蛋白質結構示意圖，具顏色區域為澱粉吸附區(SBD)、黃色區域為酵素催化區 (CD)。

自然界亦存在多種具備重複 CBM 功能區的蛋白質，稱為 tandem repeat。目前已知具有重複澱粉吸附區的天然 CBM 家族包括 CBM6、CBM9、CBM22、CBM25、CBM26、CBM32、CBM40、CBM41、及 CBM45 等，如圖二所示[6]。

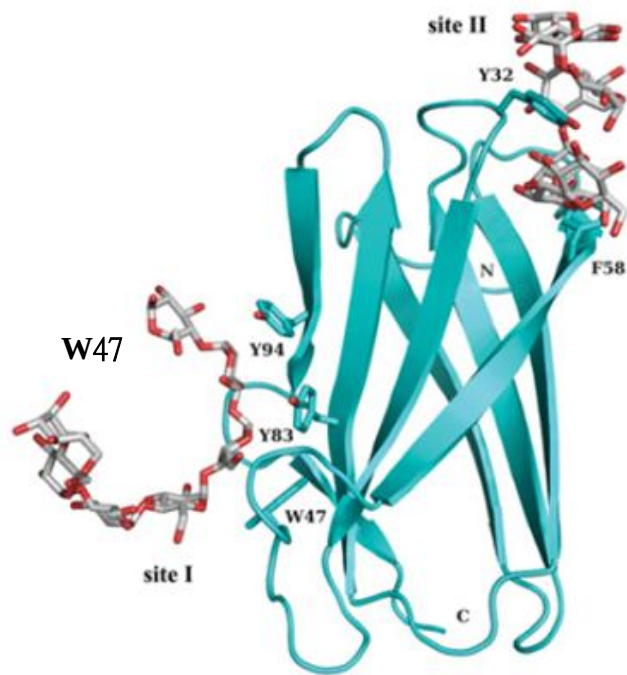


Guillen, D. *et al.* Appl Microbiol Biotechnol 85 , 1241-1249, 2010.

圖二 具有重複澱粉吸附區的天然 CBM 蛋白質

含重複 CBM6、CBM9、CBM22、CBM25、CBM26、CBM32、CBM40、CBM41、及 CBM45 之蛋白質結構示意圖，灰色區域為碳水化合物吸附區(CBM)、綠色區域為酵素催化區(CD)。

本實驗使用的蛋白質為 *Rhizopus oryzae* glucoamylase (RoGA)，為根黴菌分泌的含 579 胺基酸、分子量 63,068 Da 之胞外酵素，其結構包括 N 端澱粉吸附區 (RoSBD) 及 C 端酵素催化區(CD)。此酵素可水解澱粉分子中的 α 1-4 及 α 1-6 鍵結，將不可溶的澱粉完全分解為可溶性的葡萄糖分子。RoSBD 為含 106 胺基酸、分子量 12,719 Da、不具水解活性之蛋白質功能區。由 X 光繞射分析解出之 3D 立體分子結構顯示 RoSBD 為由 8 個 β 摺板形成的功能區，其中芳香族胺基酸 Y32 及 W47 為 2 個重要的配體結合區，如附圖一由直鏈形狀七單元葡萄糖(G7)與 RoSBD 形成的 RoSBD-G7 複合體晶體結構所示[7]。

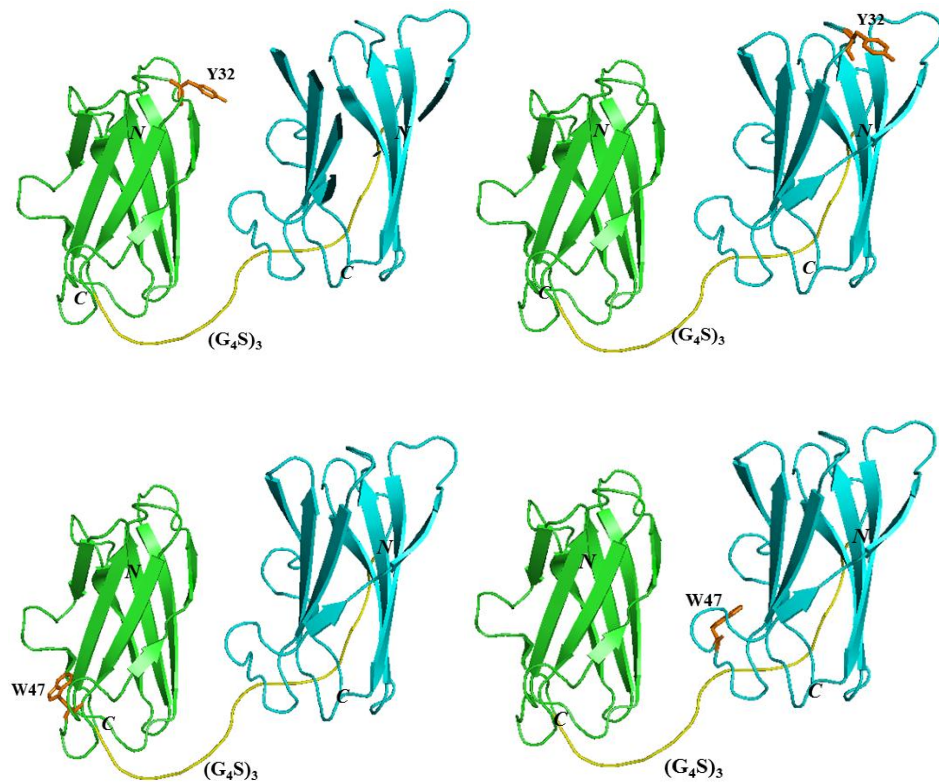


Y32

附圖一 RoSBD-G7 複合物晶體結構圖

右上角為 Y32 吸附區 左下角為 W47 吸附區

依據天然的酵素含有重複 CBM 結構，本實驗亦採用二聚體澱粉吸附區(RoSBD dimer)及其定點突變株 Y32-WT、WT-Y32A、W47A-WT、及 WT-W47A(圖三)，以比較單一 RoSBD 及重複 RoSBD 之功能差異，並探討芳香族胺基酸 Y32 和 W47 的重要性。



圖三 突變株 RoSBD dimer 示意圖

左上: RoSBD dimer Y32A-WT 右上: RoSBD dimer WT-Y32A

左下: RoSBD dimer W47A-WT 右下: RoSBD dimer WT-W47A

此外，近期文獻報導能適應不同濃度鹽環境的耐鹽性(halophilic) *Kocuria varians* α -Amylase 之分子結構包括 N 端酵素催化區及 C 端 2 個連續的澱粉結合區 KvSBD1 及 KvSBD2[8]。KvSBD 之序列與具有天然重複吸附區的 CBM25 蛋白質相似，該文作者在文中將 KvSBD dimer 以 KvSBD 12 表示[8]。本實驗最後探討 RoSBD dimer 及 KvSBD12 相同及相異的性質，並提出 RoSBD dimer 解開澱粉糖螺旋結構的交互作用模型。

澱粉及纖維素均可經由生化程序轉換成酒精，為製造生質酒精的關鍵步驟，本研究成果可協助探討不同酵素及蛋白質對於生質能源材料的影響及應用。

二、研究目的

1. 探討影響澱粉—碘錯合物結構的因子
2. 確認澱粉結合區的生化活性
3. 比較澱粉結合區數目影響澱粉—碘錯合物結構的能力
4. 建立重複澱粉結合區影響澱粉—碘錯合物結構的反應模型

三、研究設備

儀器：紫外光-可見光光譜儀、微量吸管分注器(10 μ l、100 μ l、1000 μ l)、微量試管(200 μ l、600 μ l、1.5 ml) 電子秤、乾浴器、微量離心機、溫度控制水浴槽、震盪混合器、石英比色管、血清瓶、電泳槽、電腦。

藥品：G7 (分子量 1152 Da)、amylose EXI (分子量 12772 Da)、potato soluble starch (分子量 6800-8000 Da)、amylose EXIII(分子量 15372 Da)、corn starch (分子量大於 10^7 Da)、緩衝溶液- sodium phosphate (pH7.4)、葡糖澱粉酶 (GA、分子量 68000 Da)、澱粉吸附蛋白 (SBD、分子量 12719 Da)、澱粉盤、碘液 (I_2 /二甲基亞砷<DMSO>)、去離子水、樣品溶液、通用電泳緩衝液、追蹤染劑、染色液、脫色液。

四、研究方法

(一) 藥品配置

表一 實驗藥品

藥品	分子量 (Da)	濃度
Amylose EXI	I2772	3 mg/mL
Soluble starch (potato)	6500-8000	3 mg/mL
緩衝溶液- Sodium phosphate (pH7.4)	164	
葡糖澱粉酶 (RoGA)	68000	405 μ M
澱粉吸附蛋白質(RoSBD)	12719	734 μ M
澱粉吸附區二聚體(RoSBD dimer)	24530	148.3 μ M
突變株 RoSBD dimer WT-W47A	24420	248.8 μ M
突變株 RoSBD dimer W47A-WT	24420	136.5 μ M
突變株 RoSBD dimer WT-Y32A	24440	164.4 μ M
突變株 RoSBD dimer Y32A-WT	24440	264.7 μ M
突變株 RoSBD dimer W47A-W47A	24310	185.2 μ M
突變株 RoSBD dimer Y32A-Y32A	24350	133.3 μ M
碘液 (I_2 /二甲基亞砷<DMSO>)		
去離子水	18	

1. 碘溶液

- (1) 加入 0.0062 g I_2 於 1 ml DMSO 配置 0.025 M I_2 /DMSO 碘溶液

2. 1.5%澱粉膠盤

- (1) 取 1.5 g 澱粉 (Starch) 與 0.8 g 洋菜膠 (Agar) 溶於 100 mL 去離子水中，將血清瓶置於加熱盤上加熱並攪拌至完全溶解。
- (2) 將配好的澱粉膠溶液以高溫高壓滅菌，待稍微冷卻後倒入培養皿中(每培養皿約 15 mL，需於無菌操作台中操作)。
- (3) 將澱粉膠盤放在無菌操作台內，待澱粉膠凝固後便可使用。

3. 澱粉糖溶液

- (1) 取 3 mg 糖 (Amylose EXI、Amylose EXIII、Soluble Starch) 加入 1.5 mL 微量試管中，加入 1 mL 50 mM sodium phosphate (pH7.4)

緩衝溶液(buffer)

(2) 將微量試管置於乾浴器中加熱至 90 °C 以產生最大溶解度

4. 澱粉結合區

(1) 野生型重組蛋白質 RoSBD 及 RoSBD dimer 由指導教授實驗室提供

(2) 突變株重組蛋白質 RoSBD dimer WT-W47A、RoSBD dimer W47A-WT、RoSBD dimer WT-Y32A、RoSBD dimer Y32A-WT、RoSBD dimer W47A -W47A、RoSBD dimer Y32A- Y32A 由指導教授實驗室提供

(二) 澱粉酶及澱粉吸附蛋白質對於澱粉盤上澱粉-碘錯合物形成之影響

1. 將 800 ml 12.5 mM 碘液加入澱粉盤
2. 再將 2 µl buffer、1.38 µl RoSBD、2.53 µl RoGA 分別加在澱粉盤上。
3. 反應 30 分鐘並照相記錄

(三) GA、SBD 及反應條件對於不同長度之澱粉-錯合物的影響

1. 分別將 80 µl buffer 與 20 µl 糖(G7、amylose EXI、soluble starch、amylose EXIII、corn starch)加入 200 µl 試管混合均勻
2. 加入碘液混合均勻
3. 加入 buffer、RoSBD、RoGA 觀察其變化，在 0, 3, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 30, 50 分時照相記錄。

(四) 澱粉-碘錯合物特性分析

1. 設定掃描光譜各項參數

Reference: 去離子水 掃描模式: Wavelength

吸收波長 200-800 nm、溫度 25 °C、10 mm 石英比色管

- (1) 依序測量 100 μ L 去離子水、50 mM sodium phosphate buffer 之全波長吸光值。
- (2) 將 1 μ L 25 mM I₂/DMSO 碘溶液加入 100 μ L 50 mM sodium phosphate buffer 中，測量吸收值後洗掉。
- (3) 加入 20 μ L 已溶解的糖至 80 μ L 50 mM sodium phosphate buffer 中，測量吸收值。
- (4) 將 1 μ L 25 mM I₂/DMSO 碘溶液加入步驟 3 的溶液反應 10 分鐘，測量吸收值。

2. 掃描模式: Time scan

設定: 掃描 60 秒、吸收波長 570~650 nm、溫度 25 °C

- (1) 依序測量 100 μ L 去離子水、50 mM sodium phosphate buffer 之吸光值。
- (2) 由 100 μ L 50 mM sodium phosphate buffer 中取出 20 μ L 溶液，加入 20 μ L 已溶解的糖，測量吸收值。
- (3) 加入 1 μ L 25 mM I₂/DMSO 碘溶液反應 10 分鐘，測量吸收值 (1.5~2)。
- (4) 設定: 掃描 1 小時~3 小時，吸收波長 570~650 nm
記錄澱粉-碘錯合物的吸收值，加入 10 μ M 蛋白質，測量吸收值。

3. 數據處理

- (1) 分析蛋白質影響吸光值之變化

$$Abs_t = \frac{100 + X}{100} \times Abs_{det}$$

$$\Delta Abs. (\%) = (Abs_{AI} - Abs_t) / Abs_{AI} \times 100$$

Abs t: 隨著反應時間變化的相對吸收值 (扣除體積稀釋的影響)

X：加入的蛋白質溶液體積(μL)

Absdet：隨著反應時間變化的實際吸收值

ΔAbs (%)：吸收值的變化

AbsAI：一開始的澱粉-碘錯合物實際吸收值

以反應時間為橫坐標，ΔAbs (%)為縱座標作圖。

(2) 計算澱粉溶液及醣分子的莫耳吸收係數

$$A = \varepsilon \times B \times C$$

A：吸光度

ε：莫耳吸收係數，單位為 cm⁻¹mol⁻¹L

B：吸收介質厚度，單位 cm

C：吸光物質濃度，單位為 mol/L

(3) 以 GraphPad Prism 5 Demo 計算蛋白質吸收值 ΔA 變化曲線之半生期(t_{1/2})，並將所得數值平均算出標準差

半生期計算公式

One phase decay $Y = (Y_0 - \text{Plateau}) \cdot \exp(-K \cdot X) + \text{Plateau}$

X: 時間

Y: 由Y₀開始至穩定期

Y₀: 為 X=0 的 Y 值

Plateau: 穩定期為 X 時間為無限時的 Y 值

K: K 為速率常數

Half-life 半生期 為衰退至一半的時間

Span: 為 Y₀與穩定期之間的差值

(五) 蛋白質膠體電泳分析(SDS-PAGE)

下膠 15% (5 片): H₂O 8825 μl

40% acrylamide mix 9375 μl

1.5 M 三羥甲基氨基甲烷 Tris(pH8.8) 6300 μl

10% 十二烷基硫酸鈉 SDS 250 μl

10% 過硫酸銨 ammonium persulfate 250 μl

TEMED 10 μl

上膠 15% (5 片): H₂O 3610 µl

40% acrylamide mix 620 µl

1.5 M Tris(pH8.8) 630 µl

10% SDS 50 µl

10% ammonium persulfate 50 µl

TEMED 10

1. 測定蛋白質分子量

- (1) 架膠片組合到電泳槽，加入通用電泳緩衝液於正負極槽內。
- (2) 取蛋白質樣本溶液，加入同體積樣品溶液及適量之追蹤染劑 bromophenol blue，混勻後在 100 °C 加熱 10 分鐘，放冷後注入樣本槽，並注入蛋白質標準溶液以為對照，以 100~150 V 進行電泳。
- (3) 待追蹤染料泳動到底邊，中止電泳，取出膠片進行 CBR 染色約 30 分鐘。
- (4) 回收染劑，水沖洗藍色膠片，再倒入 20 ml 脫色液，脫色數次，可見蛋白質色帶的出現。

2.

- (1) 將 45.42 µM 的蛋白質加入 10 mg/mL 的澱粉 100 µl。
- (2) 在微量試管中加入迷你攪拌子，使之於室溫分兩組旋轉攪拌 1 hr 和 3 hr。
- (3) 取出迷你攪拌子，以 13000 r.p.m 離心 5 分鐘。
- (4) 取 200 µl 上清液(S)，再加入 200 µl 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.6 沖洗下層澱粉，以 13000 r.p.m 離心 5 分鐘。

- (5) 取 200 μ l 上清液為 Wash 溶液(W)。
- (6) 加入 200 μ l 10 mM glycine/NaOH pH11 回溶澱粉，使蛋白質脫離澱粉取得先前與澱粉結合的蛋白(P)。
- (7) 從 200 μ l 中取 20 μ l 待測蛋白質加入 15%SDS PAGE，加入同莫耳樣品溶液及適量之追蹤染劑 bromophenol blue，以 100~150 V 進行電泳。待追蹤染料泳動到膠片底邊時中止電泳，取出膠片進行 CBR 染色約 30 分鐘。
- (8) 以水沖洗藍色膠片，再倒入 20 ml 脫色液，脫色數次，可見蛋白質色帶(band)的出現。
- (9) 利用 Gel-Pro analyzer 軟體計算每個色帶的相對數量比例。

(六) 澱粉－碘錯合物半生期分析

Definition? Formula? Average??

(七) 蛋白質序列及結構分析

1. 蛋白質序列比對

- (1) 將兩條待比對的蛋白質胺基酸序列進行排比分析，使用清華大學生命科學系與海洋大學生物資訊實驗室共同開發的生物序列比對網站工具(MISA)進行分析。網址為 <http://misa.cs.ntou.edu.tw>。序列排比工作採用系統預設參數為主，包括選用蛋白質序列、視窗大小設為 5 個胺基酸、可容忍錯誤胺基酸數為 2。
- (2) 依序列排比結果進行兩序列共同保留胺基酸片段的分析與預測。

2. 蛋白質序列查詢

- (1) 將含氮鹼基(A、T、G、C)序列進行轉譯分析，輸入 DNA 序列至 <http://www.expasy.org> 網站並執行轉譯分析。

- (2) 系統依照密碼子轉換表(codon table)將含氮鹼基(A、T、G、C)序列轉換成胺基酸序列。

3. 蛋白質結構查詢

- (1) 尋找上述轉譯的蛋白質胺基酸序列是否已經有解析的蛋白質結構，將胺基酸序列輸入到清華大學生命科學系與海洋大學生物資訊實驗室共同開發的序列分析系統(BIMFG)，網址為 <http://bimfg.cs.ntou.edu.tw>。選定蛋白質序列分析及”blasts”選項功能，透過序列比對，尋找美國 Protein Data Bank 資料庫，網址為 <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> 中是否有相似序列的蛋白質已經解析出的 3D 立體結構。
- (2) 系統依胺基酸序列的相似度及已經具有相對應的蛋白質結構進行排序。檢視序列的相似度、記錄蛋白質結構代碼(PDB ID)、並選取最合適的結構作為後續結構排比分析的資料來源。

4. 比較多種澱粉結合區序列及結構排比

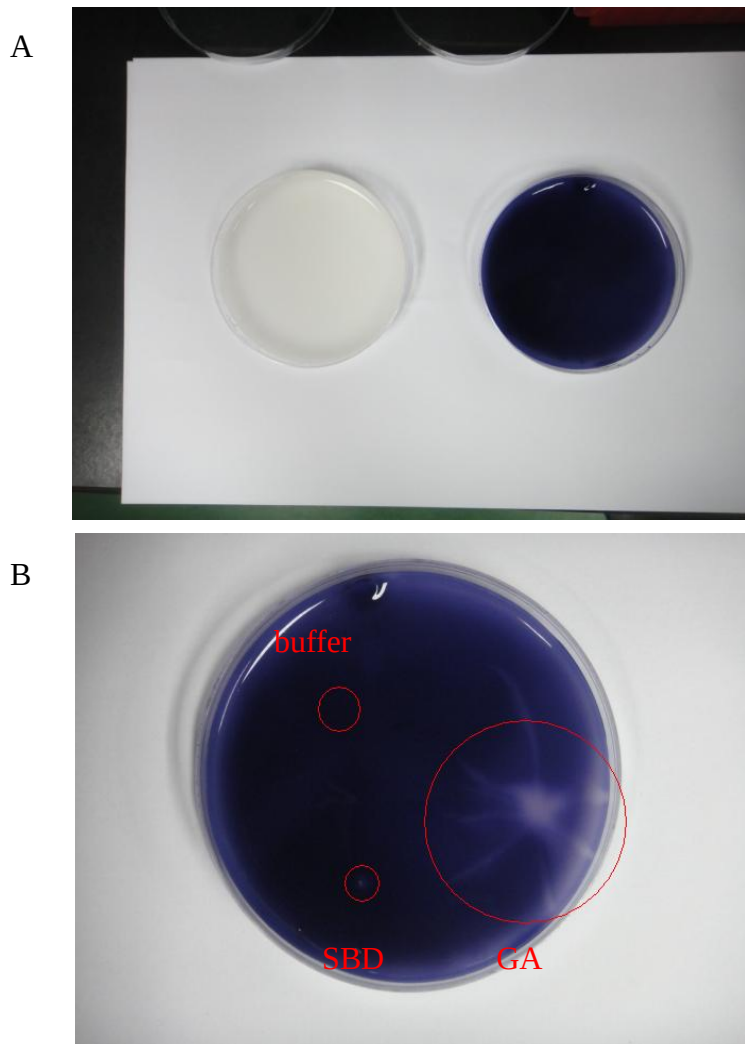
- (1) 輸入蛋白質結構代碼並進行重複蛋白質澱粉吸附區序列偵測，系統網址為 <http://iris.cs.ntou.edu.tw>
- (2) 將選取的蛋白質結構代碼輸入到清華大學生命科學系與海洋大學生物資訊實驗室共同開發的蛋白質結構排比系統(AIR)，並截取吸附曲的序列進行澱粉結合區的結構分析，系統網址為 <http://air.cs.ntou.edu.tw>。
- (3) 輸入兩條蛋白質結構代碼後，選預設參數讓系統自動執行排比的動作。系統將結構縮放、位移及旋轉後依最佳的位置重疊後呈現，透過 3D 技術顯示結構相對位置，可選擇重要的胺基酸位置，觀察不同結構在結合區位置所相對應的胺基酸內容是否具有類似的物理化學特性，經旋轉及位移的操作後擷取最佳 3D 虛擬畫

面作為後續分析的參考依據。

五、實驗結果

(一) 澱粉結合區(RoSBD)具備影響澱粉-碘錯合物結構的生化活性

澱粉盤加入碘液後變成藍色(圖四 A)，與文獻報導產生藍色錯合物相符；加入 buffer 的區域沒有顏色變化，加入 RoSBD 的區域變成白色的一點，加入 GA 則有大片區塊變白(圖四 B 紅圈內)。本結果顯示兩種蛋白質均可影響澱粉-碘錯合物特性，同時具備澱粉吸附區和催化區的 GA 反應較僅含澱粉吸附區的 RoSBD 明顯。



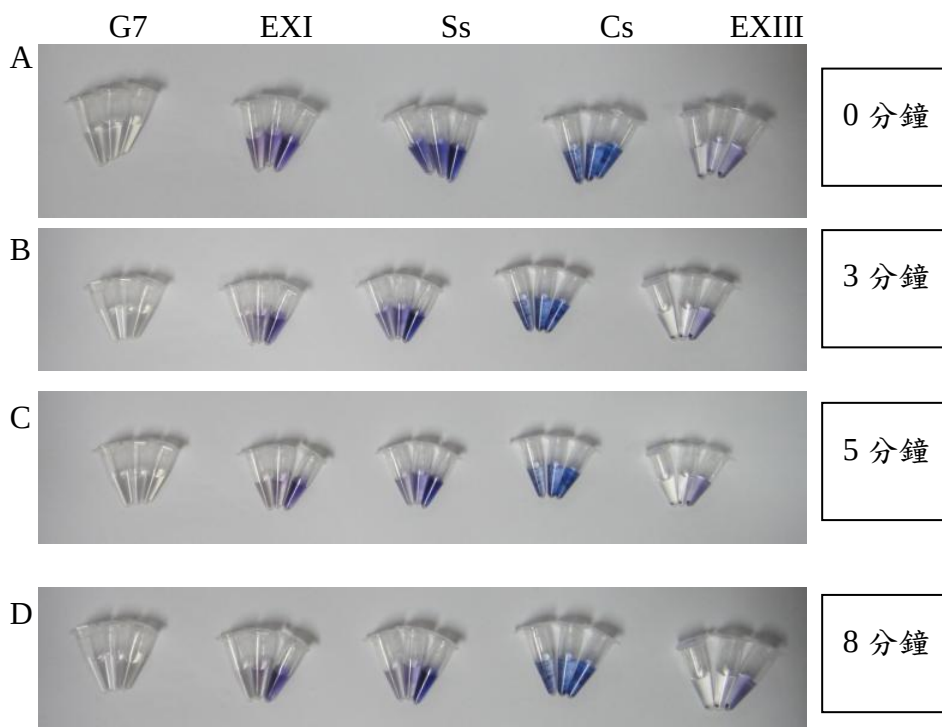
圖四 澱粉酶及澱粉吸附蛋白質對於澱粉盤上澱粉-碘錯合物形成之影響

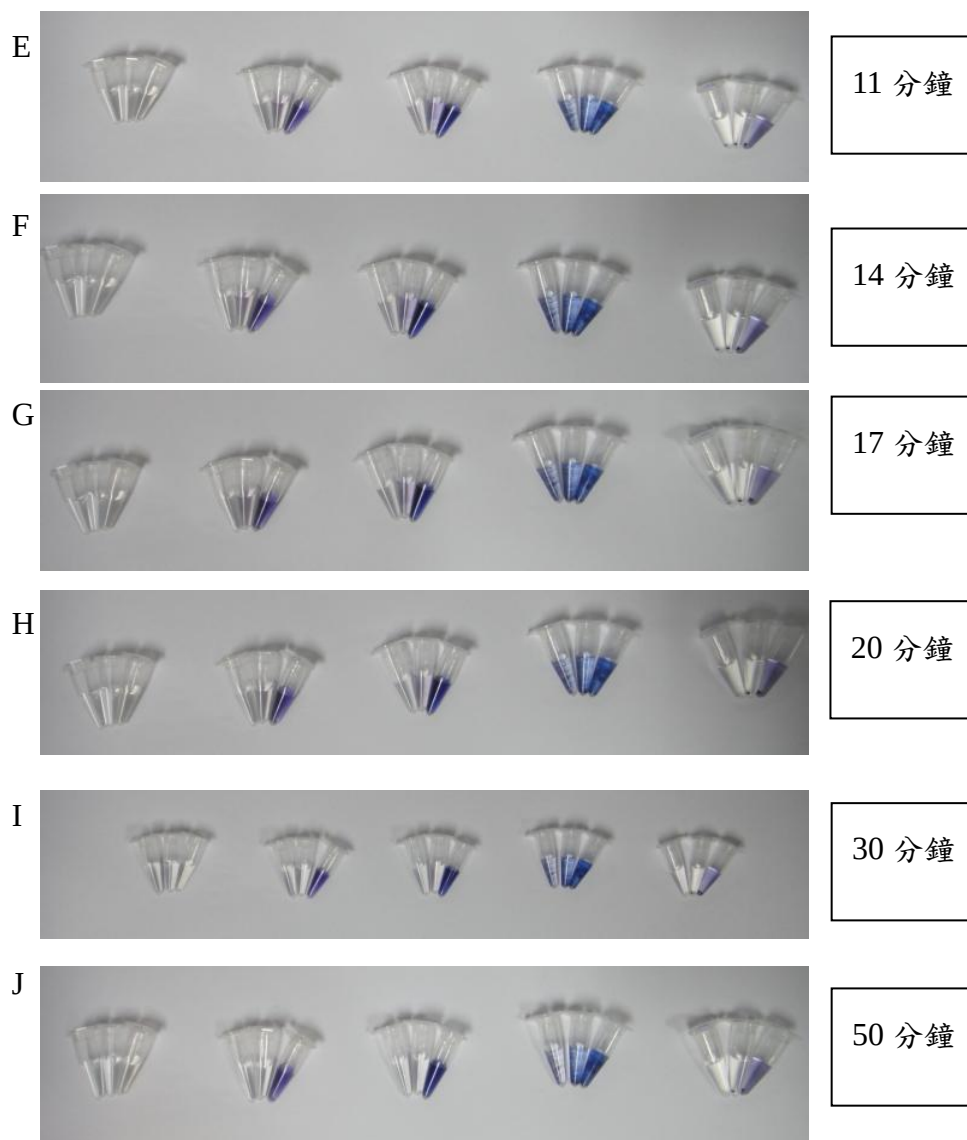
(A) 左：加入澱粉盤加入 buffer，右：澱粉盤加入碘液

(B) 加入碘液，再滴入 buffer、RoSBD、RoGA 於澱粉盤反應 30 分鐘

(二) RoGA、RoSBD 及反應時間對不同長度之澱粉-錯合物的影響

1. G7 加入碘液後並無變藍紫色(圖五 A-J)
2. Soluble starch 及 amylose EXI 加入碘液的反應變色最明顯，所以選為後續實驗材料(圖五 A-J)
3. Amylose EXIII 不易溶於水，加入碘液後變成淺藍色，變化不大(圖五 A-J)
4. Corn starch 不溶於水且加入碘後變色不均勻，不適合此實驗(圖五 A-J)
5. 比較左中右三試管發現 RoGA 變色比 RoSBD 快，buffer 不變色(圖五 A、E、I)
6. RoSBD 反應溶液最後也變透明，表示 RoSBD 也能使澱粉結構變形，使碘失去與澱粉錯合的能力(圖五 J)

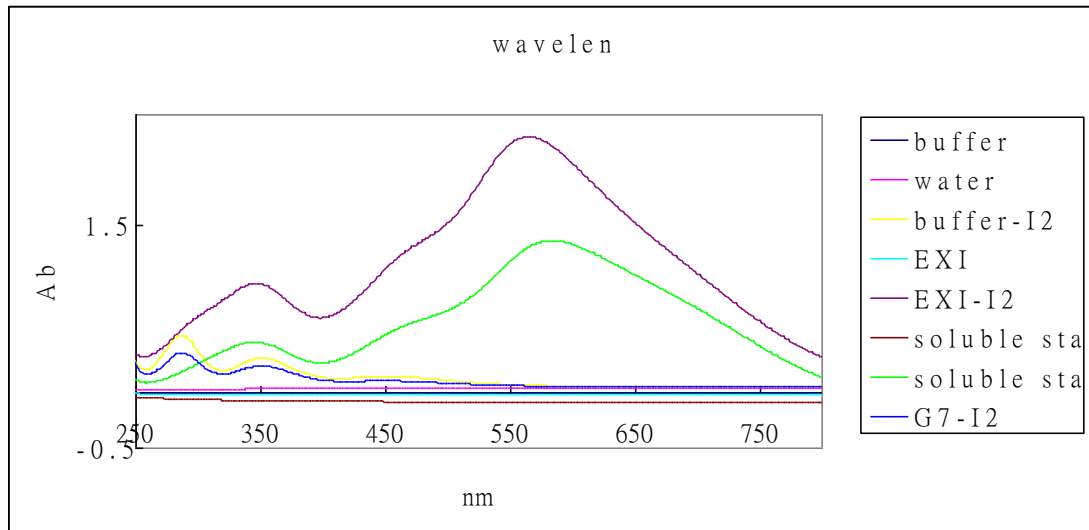




圖五 RoGA、RoSBD 及反應時間對於不同長度之澱粉-錯合物的影響
五種醣類由左到右分別為 G7、amylose EXI、soluble starch、corn starch 及 amylose EXIII，三支微量試管由左至右加入 RoGA、RoSBD 及 buffer

(三) 不同澱粉-碘錯合物之最大吸光值介於 570 nm 及 580 nm 之間

1. G7 加入碘液並無本身的吸收峰(圖五深藍色線)
2. Amylose EXI-I₂ 的最大波峰在 570 nm，以波長為相關後續實驗標準
(圖五紫色曲線)
3. Soluble starch-I₂ 的最大波峰為 580 nm，以此波長為相關後續實驗標準
(圖六綠色曲線)



圖六 各種澱粉及澱粉-碘錯合物之全光譜分析

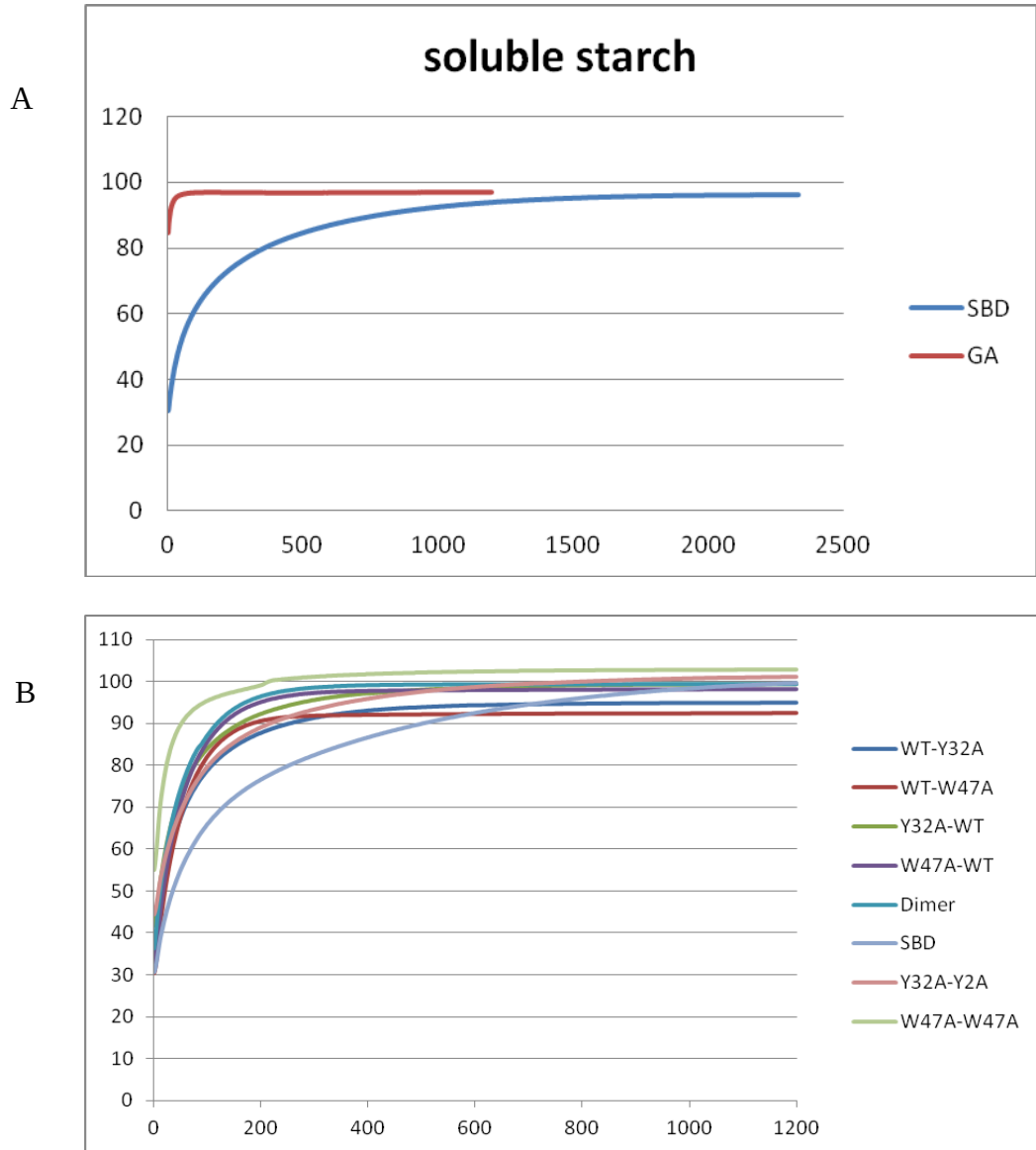
將單一試劑或不同試劑加入碘液後反應以光譜儀測量反應物於 250 nm~800 nm 吸收值

(四) 不同蛋白質對澱粉-碘錯合物於 A_{570nm} 之影響

1. **圖七 A** 藍色曲線顯示 RoSBD 會破壞澱粉-碘錯合物之螺旋結構
2. **圖七 A** 紅色曲線顯示 RoGA 會破壞 Soluble starch- I_2 之螺旋結構
3. 比較**圖七 A** 兩條曲線發現 RoGA 破壞 Soluble starch - I_2 之螺旋結構比 RoSBD 快。
4. **圖七 B** 顯示解開澱粉-碘錯合物的能力為 W47A- W47A > RoSBD dimer > W47A-WT 和 WT-W47A > Y32A-WT 和 WT-Y32A 和 Y32A-Y32A > RoSBD。
5. **表二** 顯示蛋白質解開澱粉碘錯合物所需時間(半生期 $t_{1/2}$) 為: WT-W47A > RoSBD dimer > W47A-WT > Y32A-WT > WT-Y32A > Y32A- Y32A > RoSBD。

因為 RoSBD 有兩個澱粉結合區，RoSBD dimer 則有四個。所以四個澱粉結合區的 RoSBD dimer 之破壞澱粉-碘錯合物之效率較突變後剩三個澱粉結合區的蛋白質高、RoSBD dimer 突變後剩三個澱粉結合區的蛋白質分解效率較兩

個澱粉結合區的 RoSBD 高。在突變株 RoSBD dimer 中，Y32 突變影響較 W47 突變大。比較特別的是突變兩個 W47 的突變株 RoSBD dimer 反應速率比野生行 RoSBD dimer 快，推測 W47 主要之功能為吸附不可溶配體，對於功能較強的 RoSBD dimer 吸附可溶配體可能為一不必要的構造，因此使澱粉－碘錯合物螺旋結構分解的速度更快。



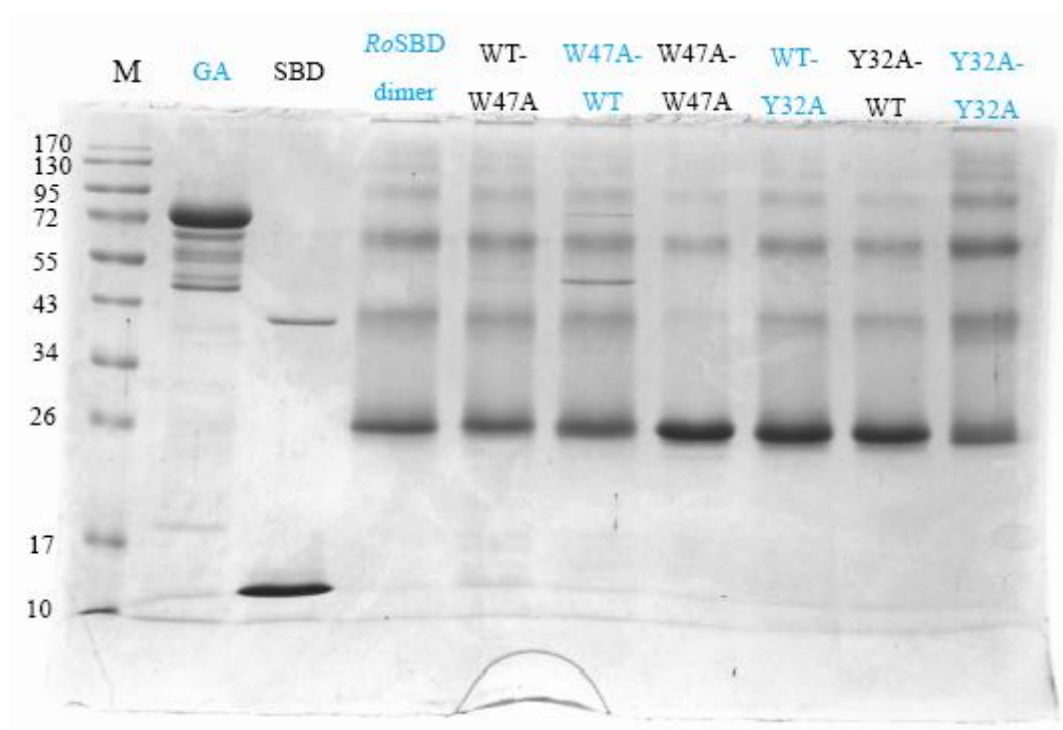
圖七 不同蛋白質對澱粉-碘錯合物 A_{570nm} 之影響

表二 不同蛋白質解開澱粉-碘錯合物 A_{570nm} 之半生期

	SBD	SBD dimer	W47A-WT	WT-W47A	Y32A-WT	WT-Y32A	Y32A-Y32A	W47A-W47A
數據	198.2	42.25	49.6	36.46	64.01	108.1	108.3	37.63
	156.8	41.03	43.64	35.87	89.74	63.37	105.5	21.22
	218.8	44.98	50.91	40.3	44.99	81.31	75.33	24.89
半生期	191.27	42.75	44.51	37.54	66.24	84.26	96.37	27.91
標準差	25.75	1.74	18.38	2.02	18.36	18.38	14.97	7.04

(五) RoSBD 及 RoSBD dimer 之蛋白質膠體電泳分析

1. 圖八顯示 RoSBD、RoSBD dimer、突變株 RoSBD dimer 及 RoGA 的蛋白質純度均超過 90%。
2. RoSBD dimer 之分子量為 24.5 kDa，約為 RoSBD 分子量 12.7 kDa 的 2 倍。
3. 3.6 個突變株 RoSBD dimer 之分子量接近，均約為 24 kDa，與估計值相當。

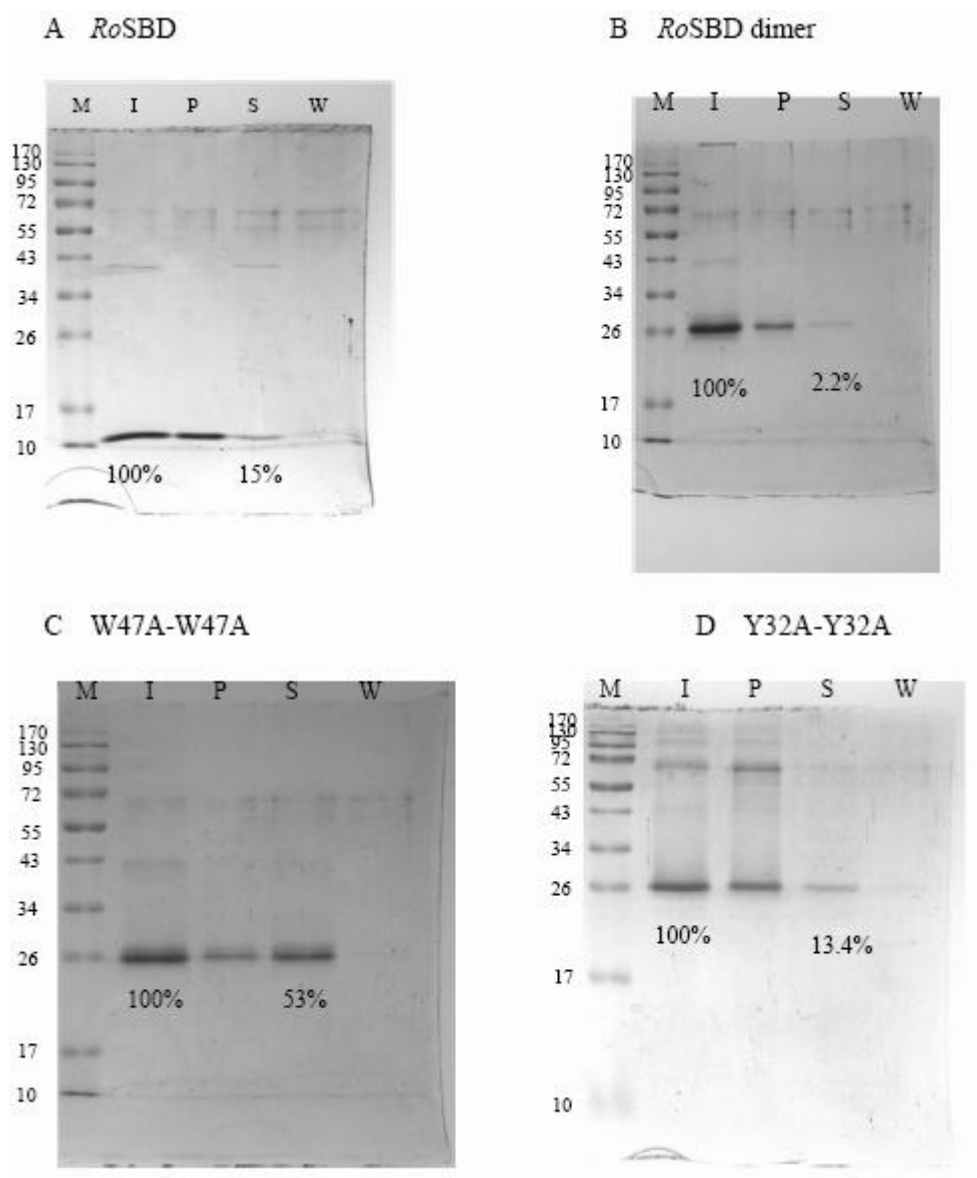


圖八 蛋白質膠體電泳圖

M: 蛋白質分子量標準品

(六) RoSBD 及 RoSBD dimer 結合澱粉之能力分析

1. 比較不同 RoSBD 及 RoSBD dimer 蛋白質與澱粉反應後之上清液 (Supernatant, S) 殘留蛋白質百分率, 以 I 為 100% 計算上清液中蛋白質的比例, 圖九顯示 W47A-W47A (53%) > RoSBD (15%) > Y32A-Y32A (13.4) > RoSBD dimer (2.2%), 表示 RoSBD dimer 結合不可溶澱粉之能力最強, Y32A 之突變影響不大, 但 W47A 影響甚鉅, 因此 W47 對於 RoSBD 結合不可溶配體之影響最強。



圖九 RoSBD 及 RoSBD dimer 及突變株對結合不可溶澱粉之影響

M: 蛋白質分子量標準品 I: 原始蛋白質量 P: NaOH 回溶澱粉，使蛋白質脫離澱粉取得先前與澱粉結合的蛋白 S: 上清液 W: 沖洗下層澱粉且離心後的上清液

(七) 比較 RoSBD 及天然重複吸附區的蛋白質結構

表三 具有天然重複吸附區的蛋白質

蛋白質	CBM 家族	菌種	重複 CBM repeat	PDB ID
maltohexaose-forming amylase	25	<i>Bacillus halodurans</i>	CBM 25*1 and CBM 26*1	2C3W
	26			2C3H
	25/26			
α -amylase	26	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	CBM 26*5	
pullulanase	41	<i>Bacillus acidopullulyticus</i>	CBM 41*1 and CBM 48*1	2WAN
	48			2WAN
pullulanase	41	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CBM 41*2	2J44
pullulanase	41	<i>Streptococcus pyogenes</i>	CBM 41*2	2J43
α -glucan, water dikinase (GWD)	45	<i>Solanum tuberosum</i>	CBM 45*2	
Starch synthase III (SSIII)	53	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CBM 53*3	
halophilic α -amylase	25	<i>Kocuria varians</i>	CBM 25*2	

蛋白質	長(aa)	配體	結合區	結合位
maltohexaose-forming amylase	102	granular starch	2	W20, W74, W34
	98		1	Y23, Y25, W36
α -amylase	953	granular starch	1	Y18, Y20, W32
pullulanase	921	amylose, amylopectin, pullulan		
	921	glycogen, starch		
pullulanase	217	amylose, amylopectin, pullulan, glycogen	1	
pullulanase	219	amylose, amylopectin, pullulan, glycogen	1	W28, W30
α -glucan, water dikinase (GWD)	1464	granular starch	1	W62, W117
Starch synthase III (SSIII)	1025	granular starch	2 (D2)	Y394; W366 (D2)
halophilic α -amylase	736	granular starch		

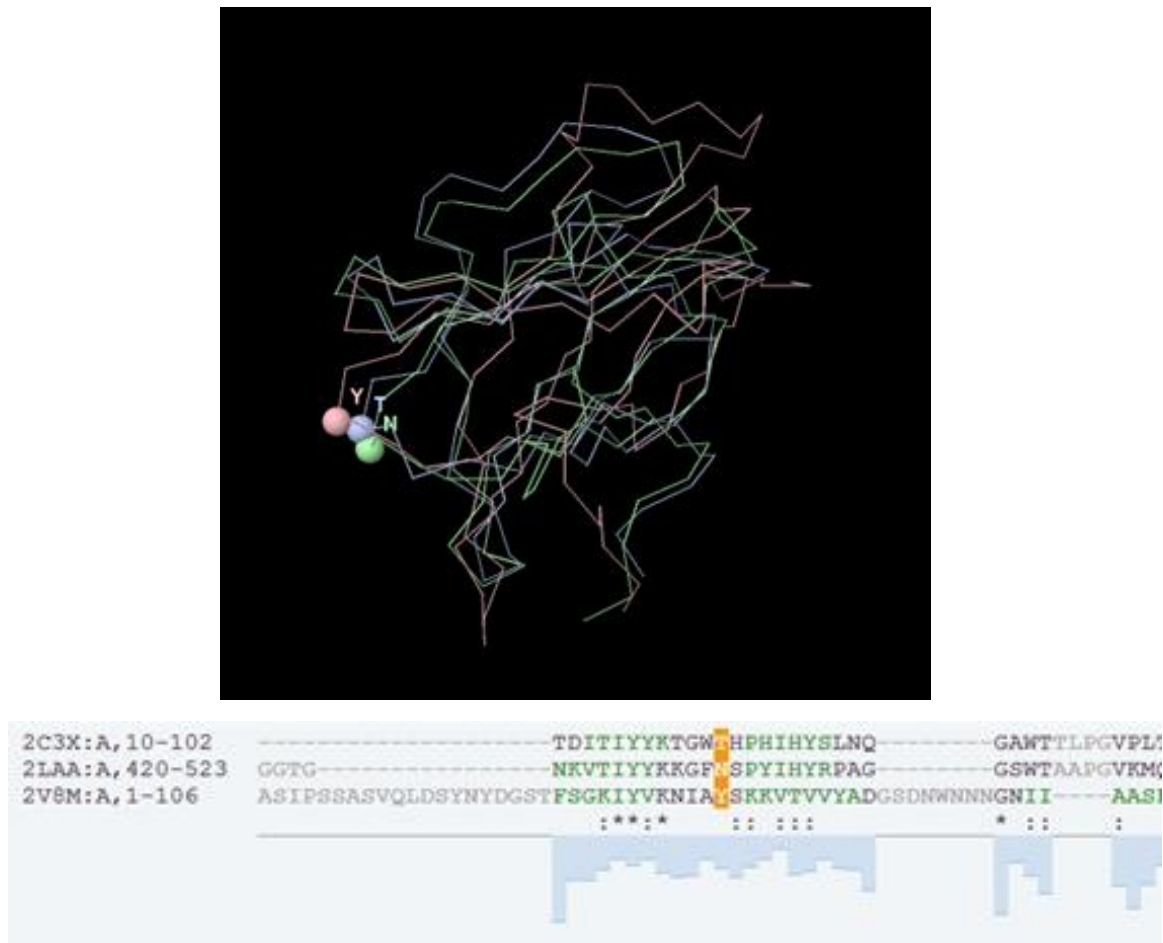
1. 蛋白質序列查詢

將核苷酸序列輸入至 <http://www.expasy.org> 執行轉譯分析後獲得蛋白質氨基酸的序列(圖九)。

3. 比較 KvSBD12 與 RoSBD 序列及結構

利用 AIR 結構排比系統進行 RoSBD 結構與 KvSBD1 預測結構的相似性分析，並依據 RoSBD 結構已知澱粉吸附區的重要結合胺基酸分析 KvSBD1 及 KvSBD2 序列中可能的澱粉結合位置。

- (1) RoSBD、KvSBD-1 及 KvSBD-2 於 Y32 吸附區的結構比較，圖中標示的胺基酸為 RoSBD 於 Y32 澱粉吸附區 KvSBD 的胺基酸

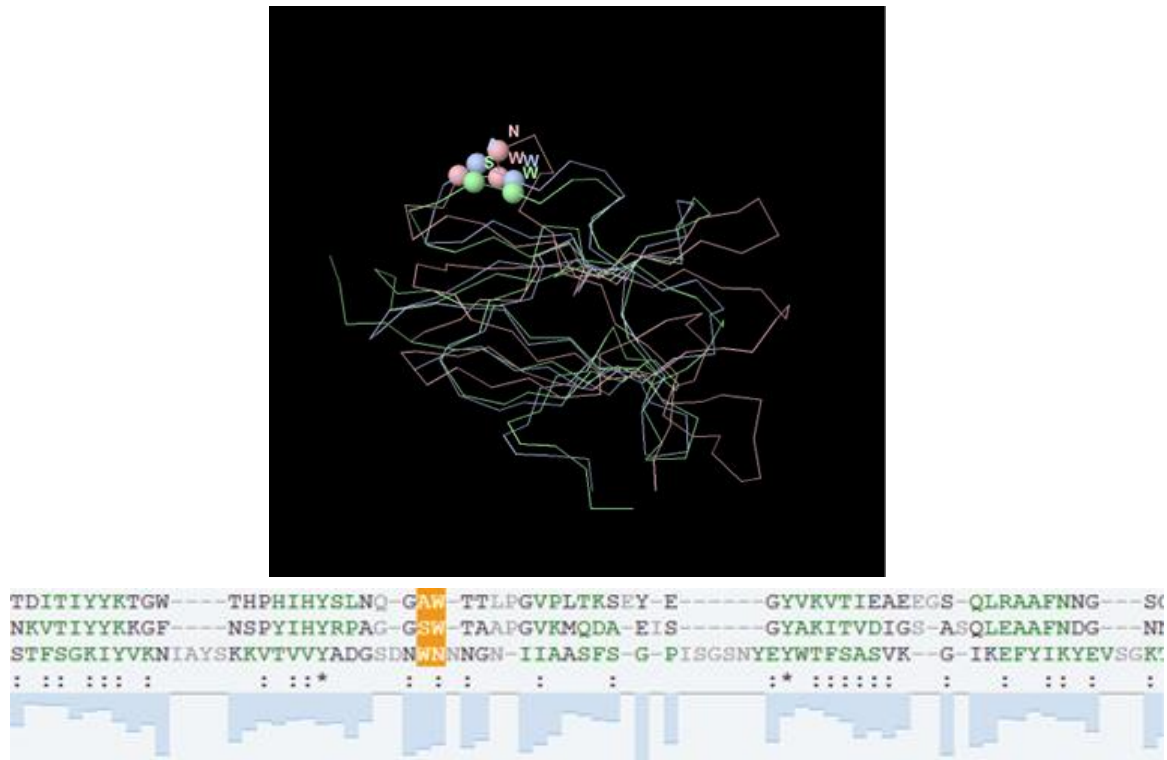


圖十一 KvSBD1、KvSBD 2 及 RoSBD 結構序列比較

藍色(2c3X)為 KvSBD1、綠色(2LAA)為 KvSBD2、紅色(2V8M)為 RoSBD 標示的胺基酸及下方橘色欄位為相當於 RoSBD Y32 之 KvSBD12 序列中的胺基酸下方藍色柱狀高度表示胺基酸相似度

- (2) RoSBD、KvSBD-1 及 KvSBD-2 於 W47 吸附區的結構比較(圖十二)，圖中標示的胺基酸為相當於 RoSBDW47 之 KvSBD 序列中

的胺基酸



圖十二 KvSBD1、KvSBD2、RoSBD 結構序列比較

藍色(2c3X)為 KvSBD1、綠色(2LAA)為 KvSBD2、紅色(2V8M)為 RoSBD；標示的胺基酸及下方橘色欄位為相當於 RoSBD W47 之 KvSBD12 序列中的胺基酸；下方藍色柱狀高度表示胺基酸相似度

由圖十一及圖十二結構排比分析圖觀察 KvSBD1、KvSBD2、及 RoSBD 之序列相關性

- (1) 三個蛋白質有很高的立體結構重複性
- (2) 三蛋白質在 RoSBD Y32 附近的胺基酸都具有苯環胺基酸(Y、W、F)
- (3) 三蛋白質在 RoSBD W47 附近的胺基酸都具有苯環胺基酸(三個皆為 W)

4. 比較 RoSBD 及 *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase 的結構相似性



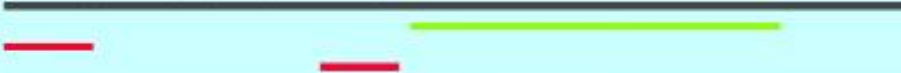
Internal Repeat Identification System

[About](#)
[IRUC](#)
[SDV](#)
[IRA](#)
[Help](#)
[Contact](#)

Internal Repeat Analyzer(IRA):

Protein domain detection(50 < IRU Length) :

§ Domain(s) in Query Sequence (Click for details)



Query

c.1.8.1

b.3.1.3

b.1.18.2

b.3.1.3
STVIVLHLEKFDSEYTHMDVMMPLQFVHNGAALQFTGTNDPFAVADT
QVPCDHTQVGLIVKNDWSEKTFPHDLHIDLAKDHEVMTVQGDPTTYLN
3
1012e-02450%
[link](#)

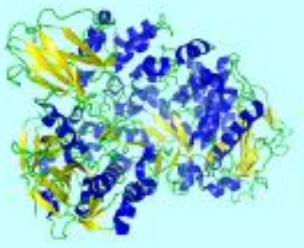
Sample : 2J73



- Class :
All beta proteins(b)
- Class Fold :
Prealbumin-like(b.3)
- Super family:
Starch-binding domain-like(b.3.1)
- Family :
(b.3.1.3)
- Domain :
(b.3.1.3)

Family	Query Subsequence	StartEnde-Value	Identity	Solennoid detection
c.1.8.1	AGMQGDEEQTEAFVDEVIYBAHVDFSIDANSGRHGRKYLAFTEHGR CDDGVKPGIDSLEELQIPVQLQGVVEPNSIDETQPOTYMAYDPMYDV PEQAYATTPEOTARITELRQLIQSLHQRLIOVMDVVYHETPOVMVSDPD KIVPQTYRTDSNGNTTNGSOGGNSFATEHMAQRVLDVHYVWVSEYDV DGFREDLMALLGSDTHAKI SNELBAINDGIVLYGEPWFGOTSGLSSDQIV TROQQKGLGLOVPNDNIRNOLDGMPDRTAQGFATODENQVIVIRNOVIO SIQDPTSAFSETINYVTSIDNHTLMDRI LASHPSDTEADRIKDELAHAV VPTSGGVVFMQGGREHLRFRDGNDSYNAGDSVWQPDWSR	416 805	5e-058	31% link

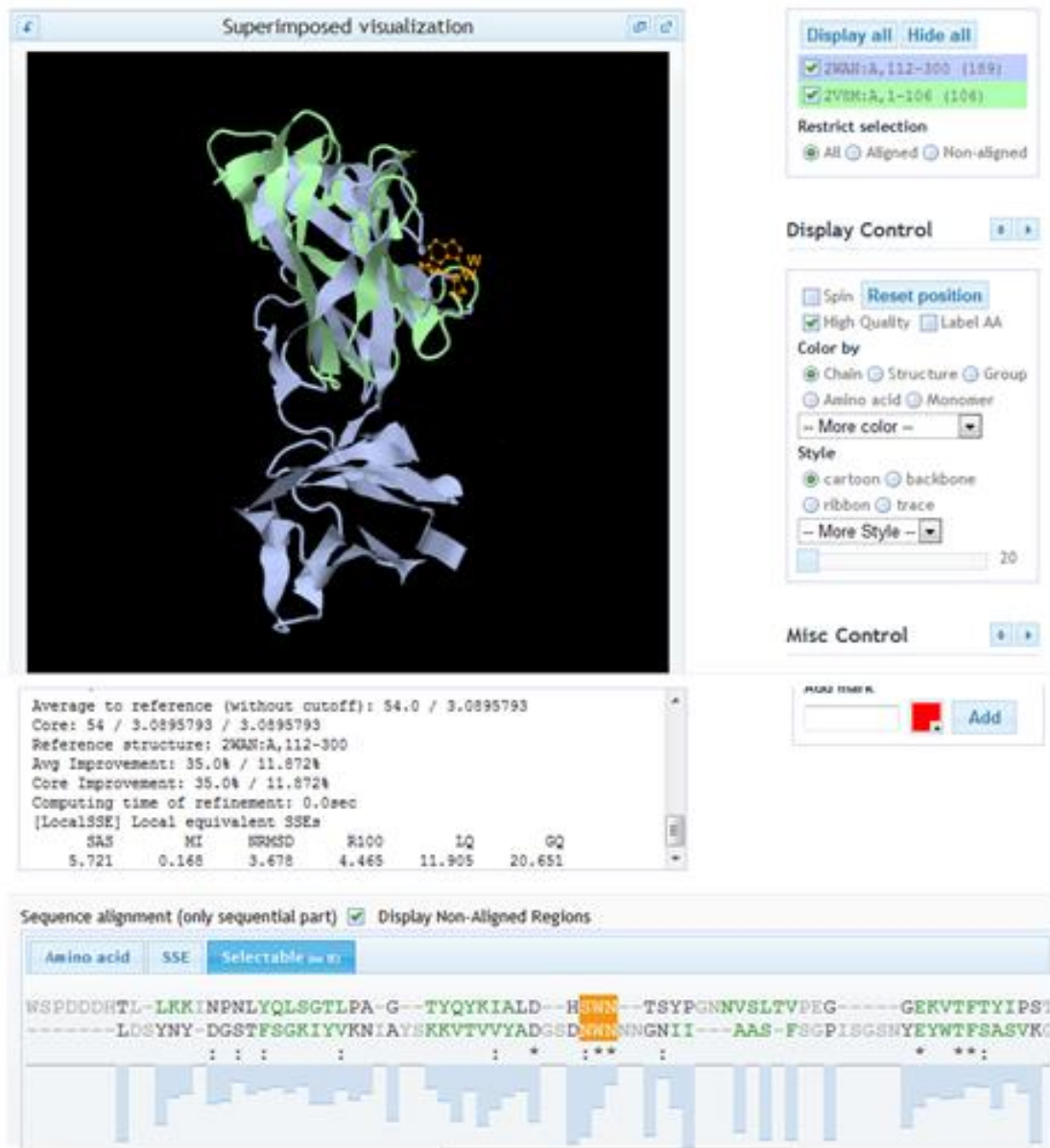
Sample : 2FHF



- Class :
Alpha and beta proteins (a/b)(c)
- Class Fold :
TIM beta/alpha-barrel(c.1)
- Super family:
(Trans)glycosidases(c.1.8)
- Family :
(c.1.8.1)
- Domain :
(c.1.8.1)

圖十三 重複蛋白質澱粉吸附區序列偵測

將找到的 *Bacillus acidopullulyticus* pullanase 澱粉吸附區的片段結構與 RoSBD 進行結構

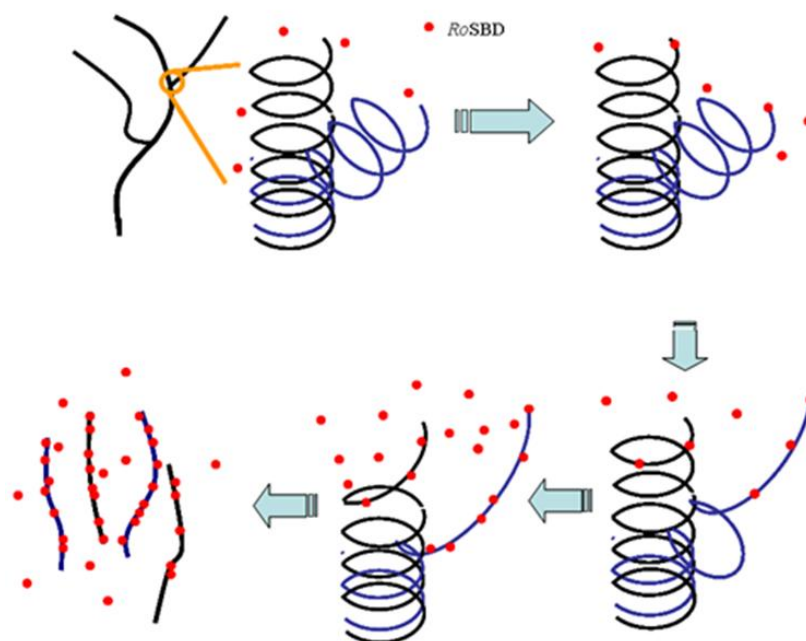


圖十四 *Bacillus acidopullulyticus* pullanase、RoSBD 結構序列比較

- (1) 兩蛋白質在 Y32 處並無相似處
- (2) 兩蛋白質於 RoSBDW47 處(*Bacillus acidopullulyticus* pullanase W220 處)有極高的結構及序列相似度(圖十三中黃色結合基)

六、討論

(一) 建立 RoSBD 破壞澱粉結構示意圖



圖十五 RoSBD 破壞澱粉結構示意圖

橘點為 RoSBD、黑色的分支狀為澱粉，黑色及藍色螺旋狀為澱粉放大圖；上圖表示 RoSBD 吸附螺旋狀捲曲的澱粉並將澱粉拉成直線，破壞澱粉結構[9]

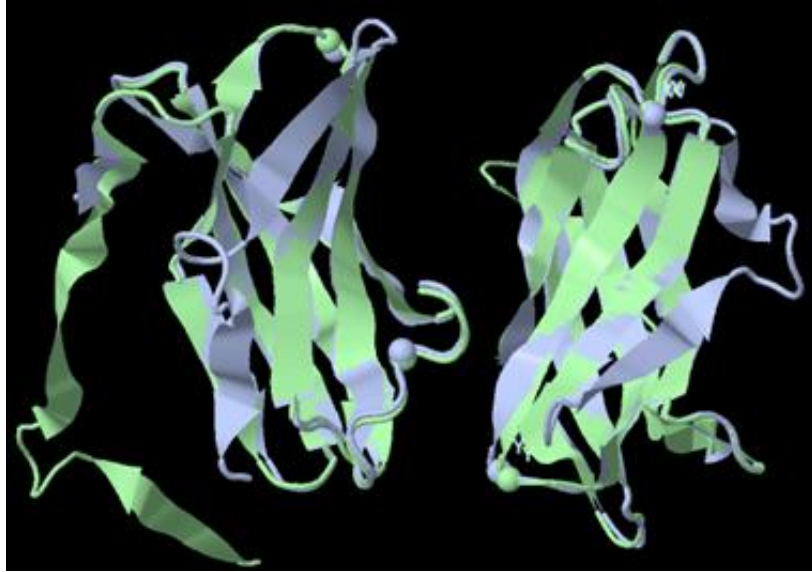
(二) RoSBD dimer 中 Y32 突變後影響比 W47 突變後明顯

將 Y32 突變後影響比 W47 突變後大，原因為 Y32 主要吸附水溶性的小分子醣，W47 則主要吸附不易溶解的大分子醣，所以在本實驗中 W47 的影響較小，但在自然界中 W47 的影響較大，主要是由於 W47 會先將大分子醣解開成小分子後，再由 Y32 水解小分子醣。

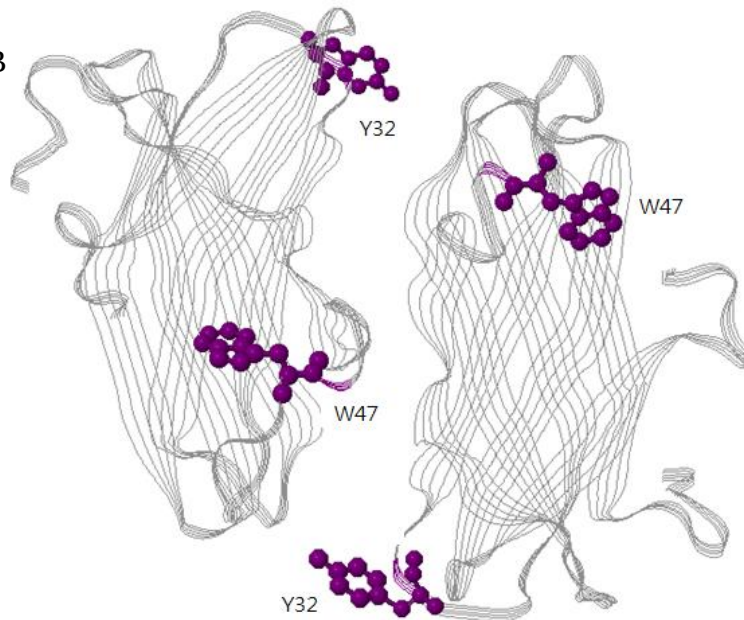


圖十六 RoSBD 環狀突變蛋白質 CP90 之二聚體晶體結構 (PDB ID:4EIB)

A



B



圖十七 模擬 RoSBD dimer 解開 Amylose EXIII 模擬圖

根據圖十五 RoSBD 環狀突變蛋白質 CP90 之二聚體晶體結構模擬 RoSBD dimer 在自然狀況下的結構(圖十六 A)，再根據表二 不同蛋白質解開澱粉-碘錯合物 A570nm 之半生期的結果推測 RoSBD dimer 結合可溶澱粉糖的結構。

七、結論

(一) RoSBD dimer 之配體結合能力較 RoSBD 強，證明 Tandem repeat SBD 之功

能為強化配體吸附力。

- (二)兩個芳香族胺基酸扮演重要但不同的角色，Y32 主要結合可溶澱粉糖、W47 主要結合不可溶澱粉，故 RoSBD dimer 實驗圖九顯示 W47 突變後結合效率最差、表二顯示 Y32 突變後效率最差。
- (三)RoSBD dimer 在水溶液中形成之結構預測如圖十七，Y32 為與可溶性配體結合的關鍵胺基酸。
- (四)自然界存在多種 Tandem repeat SBD，圖十四顯示 RoSBD 之 W47 與 BaSBD 的 W 結構保留性極高、Y32 則無保留性，推測芳香族胺基酸 W47 位置為演化過程中長期保留的最重要配體結合區

八、參考資料

1. 王孟亮 1984 《藍色的澱粉——碘錯合物結構》科學月刊 0176 期。
2. 張敬宜、柯源悌* 2002 在發育中綠豆澱粉分支酶與澱粉磷解酶的偵測 中國農化學會第四十屆年會，台北市。
3. M. A. Swanson Studies on the structure of polysaccharides IV. Relation of the iodine color to the structure. *Journal of Biological Chemistry* 825-837, 1947.
4. R. R. Baldwin *et al* The relation of starch-iodine absorption spectra to the structure of starch and starch components. *J. Am. Chem. Soc.* 66, 111 – 115, 1944.
5. J. A. Church, S. A. Dreskin on the kinetics of color development in the Landolt (“iodine clock”) reaction. *The Journal of Physical Chemistry* 1387-1390, 1967.
6. D. Guillen *et al* Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles. *Appl Microbiol Biotechnol* 85, 1241-1249, 2010.
7. J. Y. Tung *et al* Crystal structures of the starch-binding domain from *Rhizopus*

- oryzae* glucoamylase reveal a polysaccharide-binding path. *Biochem J.* 416, 27-36, 2008.
8. R. Yamaguchia *et al* Distinct characteristics of single starch-binding domain SBD1 derived from tandem domains SBD1-SBD2 of halophilic *Kocuria varians* alpha-amylase. *Protein J.* 31, 250 – 258, 2012.
 9. T. Y. Jiang *et al* Two unique ligand-binding clamps of *Rhizopus oryzae* starch binding domain for helical structure disruption of amylose. *PLoS ONE* 7, e41131, 2012.
 10. R. Yamaguchia *et al* Halophilic characterization of starch-binding domain from *Kocuria varians* amylase. *International Journal of Biological Macromolecules* 95 – 102, 2012.
 11. P. Steven *et al* Crystal structure of circular permuted RoCBM21 (CP90): Dimerization and proximity of binding sites. *PLoS ONE* 7, e50488, 2012.

評語

1. 以結構的角度探討澱粉酶吸附澱粉的機制，有其應用性。
2. 利用生物資訊的方法對此蛋白質的序列及結構有深入的分析。